

RO/KR 25.03.2004



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

REC'D 14 APR 2004

WIPO PCT

출원번호 : 10-2003-0018573
Application Number

출원년월일 : 2003년 03월 25일
Date of Application MAR 25, 2003

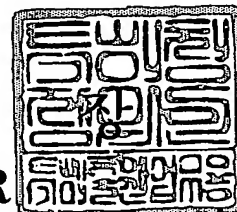
출원인 : 대한민국(관리부서:국립수산물연구원)
Applicant(s) Republic of Korea



2004 년 03 월 25 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.03.25
【발명의 명칭】	사이트로박터 브라키 유래의 파이타제
【발명의 영문명칭】	Phytase produced from Citrobacter braakii
【출원인】	
【명칭】	대한민국 (관리부서:국립수산물연구원)
【출원인코드】	2-1998-098396-4
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	1999-017541-2
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김영옥
【성명의 영문표기】	KIM, Young Ok
【주민등록번호】	690306-2093212
【우편번호】	609-838
【주소】	부산광역시 금정구 장전1동 384-27(8/2)
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김한우
【성명의 영문표기】	KIM, Han Woo
【주민등록번호】	701125-1110411
【우편번호】	608-823
【주소】	부산광역시 남구 문현3동 220-10 26/3
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이정호
【성명의 영문표기】	LEE, Jeong Ho
【주민등록번호】	671103-1117124

【우편번호】	612-766
【주소】	부산광역시 해운대구 좌동 벽산2차아파트 214동 1503호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김경길
【성명의 영문표기】	KIM,Kyung Kil
【주민등록번호】	570726-1119613
【우편번호】	611-811
【주소】	부산광역시 연제구 연산1동 304-1 경동아파트 101동 1705호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이종윤
【성명의 영문표기】	LEE,Jong Yun
【주민등록번호】	520315-1057021
【우편번호】	612-840
【주소】	부산광역시 해운대구 좌동 1321 벽산 아파트 107동 2002호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	공인수
【성명의 영문표기】	KONG, In Soo
【주민등록번호】	550414-1052119
【우편번호】	612-020
【주소】	부산광역시 해운대구 우동 경남 마리나 아파트 1-1동 204호
【국적】	KR
【우선권주장】	
【출원국명】	KR
【출원종류】	특허
【출원번호】	10-2002-0073655
【출원일자】	2002.11.25
【증명서류】	미첨부
【공지예외적용대상증명서류의 내용】	
【공개형태】	간행물 발표
【공개일자】	2002.07.01

【심사청구】 청구
【미생물기탁】
【기탁기관명】 한국미생물보존센터
【수탁번호】 KCCM-10427
【수탁일자】 2002.09.26
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 8
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의
한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
이원희 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 17 면 17,000 원
【우선권주장료】 1 건 26,000 원
【심사청구료】 7 항 333,000 원
【합계】 405,000 원
【면제사유】 국가
【면제후 수수료】 0 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_1통 3. 공지에외
적용대상(신규성상실의예외, 출원시의특례)규정을 적용받 기 위
한 증명서류_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 사이트로박터 속 균주 유래의 신규 파이타제(phytase) 효소 및 상기 효소를 생산하는 사이트로박터 브라키(*Citrobacter braakii*)에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 (a) 분자량 약 47 kDa, (b) 최적 pH 3.5-4.5, (c) 최적온도 45-55℃, (d) 파이테이트, p-니트로페닐 포스페이트, 테트라소듐 피로포스페이트, ATP 또는 ADP를 기질로 하여 작용, (e) 파이테이트를 기질로 했을 때 미카엘리스 정수가 0.3-0.5 mM, (f) 펩신, 트립신, 파파인, 엘라스타제 또는 판크레아틴과 같은 단백질 가수분해효소에 높은 저항성을 갖는 사이트로박터 속 균주 유래의 파이타제 및 상기 효소를 생산하는 사이트로박터 브라키에 관한 것이다. 본 발명의 파이타제 또는 이를 생산하는 사이트로박터 브라키는 단위동물의 사료 제조시 첨가제로 이용할 수 있으며 또한 저렴하게 파이트산의 특정 분해산물의 회수에도 사용될 수 있다.

【대표도】

도 3

【색인어】

사이트로박터 브라키, 파이타제, 파이트산, 사료첨가제

【명세서】

【발명의 명칭】

사이트로박터 브라키 유래의 파이타제{Phytase produced from *Citrobacter braakii*}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 사이트로박터 브라키 균체의 전자현미경 사진이고,

도 2는 사이트로박터 브라키 YH-15 유래 파이타제의 성장과 효소활성을 나타낸 그래프이고,

도 3은 사이트로박터 브라키 YH-15 유래 파이타제의 SDS-PAGE 전기영동 사진이고,

레인 1 : 마커, 레인 2 : 정제된 파이타제

도 4는 사이트로박터 브라키 YH-15 유래 파이타제의 생화학적 특성을 나타낸 그래프이고,

A: pH에 따른 상대 활성, B: 온도에 따른 상대 활성

도 5는 사이트로박터 브라키 YH-15의 DNA를 분리한 후 파이타제 염기서열을 이용한 탐침으로 서던 교잡반응을 수행한 결과 사진이다.

레인 1: *EcoRI* 및 *XhoI* 처리, 레인 2: *EcoRI* 처리

레인 3: *SphI* 처리, 레인 4: *BamHI* 및 *HindIII* 처리

레인 5: *EcoRI* 및 *HindIII* 처리, 레인 6: *EcoRI* 및 *BamHI* 처리

레인 7: *PstI* 처리

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<12> 본 발명은 파이트산 분해능을 갖는 효소 및 이를 생산하는 미생물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 파이트산 분해능을 갖는 신규한 파이타제(phytase)와 상기 효소를 코딩하는 유전자 및 상기 효소를 생산하는 사이트로박터 속 미생물에 관한 것이다.

<13> 파이타제는 파이트산(phytic acid; *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis dihydrogen phosphate)을 분해하여 인산염(phosphate)과 이노시톨 인산염(phosphate inositol)을 만드는 효소이다. 파이트산은 가축의 사료로 사용하고 있는 곡물의 경우 인 함량의 50~70%를 차지하지만, 물고기, 닭, 돼지와 같은 단위동물은 생체 내에 파이트산을 분해하는 파이타제가 존재하지 않기 때문에 식물성 인의 이용률이 극히 낮아서 성장에 필요한 인을 무기물 형태로 외부에서 따로 충분히 공급해줘야만 한다. 이처럼 사료에 존재하지만 단위 동물이 소화하지 못한 파이트산은 토양이나 물속에 존재하는 미생물에 의해 효소적으로 분해되어 강과 호수로 수송되어 인이 제한된 수중 환경에서 인의 대량유입으로 해조류 성장과 산소고갈을 유도하는 부영양화를 야기한다. 또한 파이트산은 중요한 미량광물질, 아미노산, 비타민 등과 킬레이팅(chelating) 후 불용화 되고, 생체에서 이용할 수 없게 되어 사료 중 영양손실을 크게 하는 항영양인자로 작용한다. 따라서 파이타제를 사료에 첨가하여 단위동물에 급여할 경우, 사료내의 불용성 인의 이용성 증가로 무기인의 급여량을 줄일 수 있어 경제적인 이익을 가져옴과 동시에 중요한 미량 생체활성물질의 이용성을 좋게 하고 동물분으로 배출되는 인의 양을 줄여 이로

인한 환경오염을 감소시킬 수 있어, 경제적 측면 뿐 아니라 환경 보호차원에서 중요한 의미를 가진다. 상기와 같이 파이타제를 사료에 첨가함으로써 얻어지는 경제적인 효과는 다가오는 세계화 시대에 대비할 수 있는 방법이 될 것이다.

<14> 파이타제의 연구는 주로 유럽을 중심으로 진행되어 왔으며(A.H.J.Ullah 등 Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, 264, 201-206; K.C.Ehrich 등 Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994, 204(1), 63-68; C.S.Piddington 등 Gene, 1993, 133(1), 55-62), 곰팡이(Aspergillus 속)에서 추출한 파이타제를 주로 사용하여 단위가축 및 물고기에 대한 효과연구 등이 진행되어 왔지만(L.G.Young 등 J Anim Sci 1993, 71(8), 2147-2150; K.D.Roberson 등 Poult Sci 1994, 73, 1312-1326; N.Simoes 등 Reprod Nutr Dev, 1998, 38, 429-440; M.Rodehutschord 등 Arch Tierernahr 1995, 48, 211-219) 파이타제가 잘라주는 인의 갯수가 한정되어 있으며, 또한 대부분이 곰팡이에서 생산하기 때문에 생육기간이 길어 경제적 생산이 쉽지 않으며, 조작이 어렵다는 문제점이 제기되고 있다.

<15> 이에, 본 발명자들은 기존의 파이타제와 비교하여 활성이 뛰어나거나 특성이 다른 파이타제를 얻기 위하여 전국 각지의 해수와 하수처리장 등지에서 얻은 수천 종의 균주 중에서 파이타제를 생산하는 신규 미생물을 분리 동정하고, 상기 미생물이 생산하는 파이타제가 역가가 뛰어나고 새로운 염기서열로 구성된 신규한 파이타제임을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <16> 본 발명의 목적은 사이트로박터 속 균주로부터 생산되는 신규한 파이타제 효소와 이를 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.
- <17> 또한, 본 발명의 목적은 상기 파이타제를 생산하는 사이트로박터 브라키(*Citrobacter braakii*)를 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

- <18> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 사이트로박터 속(*Citrobacter* sp.) 균주가 생산하는 효소로 하기의 물리화학적 성질을 갖는 파이타제를 제공한다.
- <19> (a) 분자량 : SDS-PAGE 상에서 분자량은 약 47 kDa,
- <20> (b) 최적 pH : pH 3.5- pH 4.5,
- <21> (c) 최적온도 : 45℃-55℃에서 최대 활성,
- <22> (d) 기질특이성 : 파이테이트, p-니트로페닐 포스페이트, 테트라소듐 피로포스페이트, ATP 또는 ADP를 기질로 하여 작용,
- <23> (e) 파이테이트를 기질로 했을 때 미카엘리스 정수가 0.3-0.5 mM,
- <24> (f) 펩신, 트립신, 파파인, 엘라스타제 또는 판크레아틴과 같은 단백질 가수분해효소에 높은 저항성.
- <25> 또한, 본 발명은 상기 파이타제를 생산하는 사이트로박터 브라키를 제공한다.
- <26> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<27> 본 발명은 사이트로박터 속(*Citrobacter* sp.) 균주가 생산하는 신규한 파이타제를 제공한다.

<28> 본 발명의 파이타제는 하기와 같은 물리화학적 성질을 갖는 것을 특징으로 한다.

<29> (a) 분자량 : SDS-PAGE 상에서 분자량은 약 47 kDa,

<30> (b) 최적 pH : pH 3.5- pH 4.5,

<31> (c) 최적온도 : 45℃-55℃에서 최대 활성,

<32> (d) 기질특이성 : 파이테이트, p-니트로페닐 포스페이트, 테트라소듐 피로포스페이트, ATP 또는 ADP를 기질로 하여 작용,

<33> (e) 파이테이트를 기질로 했을 때 미카엘리스 정수가 0.3-0.5 mM,

<34> (f) 펩신, 트립신, 파파인, 엘라스타제 및 판크레아틴으로 구성된 군으로부터 선택된 단백질 가수분해효소에 높은 저항성

<35> 본 발명의 파이타제는 사이트로박터 속 균주 유래의 파이타제 활성을 갖는 효소로, 상기 균주를 배양한 후 암모늄 설페이트 침전, 페닐 세파로스, DEAE-세파로스, CM-세파로스 및 Mono S HR 5/5 컬럼을 이용함으로써 분리 정제된다.

<36> 상기 파이타제는 SDS-PAGE 상에서 분자량이 약 47 kDa이고, 파이테이트, p-니트로페닐 포스페이트, 테트라소듐 피로포스페이트, ATP 또는 ADP를 기질로 하여 효소 활성을 나타낸다. 또한, 상기 파이타제는 산성 효소로서 45 내지 55℃에서 높은 활성을 나타내고, 50℃에서 최적 활성을 보인다. 또한, pH 3.0 내지 pH 7.0까지 효소활성이 안정하였고, pH 3.5 내지 pH 4.5

에서 높은 효소활성을 나타내며, 최적 pH는 4.0으로 나타났다. 다양한 금속이온 중 Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} 에 효소활성이 강하게 억제되었으며, 파이페이트에 대한 Km 값은 0.46 mM, Vmax 값은 6,027 U/mg 이다. 또한, 펩신, 트립신, 파파인, 엘라스타제 또는 판크레아틴과 같은 단백질 가수분해효소에 높은 저항성을 나타낸다(도 4, 표 5 및 표 6 참조).

<37> 본 발명의 파이타제는 사이트로박터 속 균주로부터 생산되며, 사이트로박터 브라키로부터 생산되는 것이 바람직하고, 사이트로박터 브라키 YH-15(수탁번호 : KCCM 10427)로부터 생산되는 것이 더욱 바람직하다.

<38> 상기 파이타제는 서열번호 2 또는 서열번호 2로 기재되는 서열에서 한 개 이상의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 아미노산 서열을 포함하는 N-말단 아미노산 서열을 갖고 있다. 상기 아미노산 서열은 기존에 밝혀진 파이타제 효소와 상당한 차이가 있어 본 발명의 파이타제는 신규한 효소임을 알 수 있다. 파이타제는 서열번호 7로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 것이 더욱 바람직하다.

<39> 또한, 본 발명은 상기 파이타제를 코딩하는 유전자를 제공한다.

<40> 본 발명의 파이타제는 1302개의 염기로 이루어진 파이타제의 전사해독틀(open reading frame)을 가지며, 상기 파이타제 전사해독틀은 22개의 아미노산으로 이루어진 신호서열과 411개의 아미노산으로 이루어진 서열번호 7로 기재되는 활성파이타제로 구성되어 있다. 신호서열을 제거한 활성파이타제의 분자량은 약 47,000 Da로 계산되었다.

<41> 또한 본 발명은 상기 파이타제를 생산하는 사이트로박터 브라키를 제공한다.

<42> 본 발명의 파이타제를 생산하는 사이트로박터 브라키는 사이트로박터 브라키 YH-15(*Citrobacter braakii* YH-15)(수탁번호 : KCCM 10427)인 것이 바람직하다.

<43> 본 발명에서는 부산 근교의 해수와 하수처리장에서 채취한 시료로부터 파이테이트를 분해할 수 있는 파이타제를 생산하는 균주를 분리하였다. 상기 균주에서 생산되는 파이타제의 활성을 측정하여, 이 중 가장 높은 활성을 보이는 균주를 16S rRNA 서열 분석과 API 키트를 사용하여 동정한 결과, 본 발명의 균주는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 16S rRNA를 갖고 있고, 이는 사이트로박터 브라키 균과 99.0%의 상동성을 보이고 사이트로박터 프라운디아와 사이트로박터 베크마니, 엔테로박터 에어로지너스균와는 98%의 상동성을 보이는 신규한 균주임을 알 수 있다.

<44> 상기 균주는 그람 음성균으로, 세포의 크기가 0.5 ~ 1.4 μm 의 간상(rod)형이며 편모(flagellum)가 관찰된다(도 1 참조). 또한, 생화학적 및 생리학적 특성을 조사한 결과, 호기 및 혐기성 상태에 모두 생육하는 편성 호기성(facultative) 미생물이고 오르니틴 디카르복실라제(ornithin decarboxylase)에 양성, 인돌(indole) 생산능에 음성, 사이트레이트 이용능에 양성, 아세톤 생산능, 황화수소 생성능, 젤라틴 액화능 및 라이신 디카르복실라제에 음성인의 결과를 나타낸다(표 2 참조).

<45> 본 발명자들은 상기 균주의 형태적, 생리생화학적 특성 및 16S rDNA 분석결과를 바탕으로 본 발명에서 분리한 균주를 신규한 사이트로박터 브라키로 동정하고, 상기 균주를 "사이트

로박터 브라키 YH-15(*Citrobacter brakii* YH-15)"라 명명하고, 이를 2002년 9월 26일자로 한국 미생물보존센터(KCCM)에 기탁하였다(수탁번호 : KCCM 10427).

<46> 또한, 본 발명은 사이트로박터 브라키 또는 상기 균주로부터 생산되는 파이타제를 함유하는 사료첨가제를 제공한다.

<47> 본 발명의 사료첨가제는 사이트로박터 브라키(수탁번호 : KCCM 10427) 또는 상기 균주로부터 생산되는 파이타제를 유효성분으로 함유하는 것이 바람직하다. 본 발명의 사료첨가제는 단위가축에 급여하는 곡류내 인의 체내 이용성을 높여주는 파이타제를 포함하고 있어, 가축 사료의 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

<48> 본 발명의 사료첨가제는 건조 또는 액체 상태의 제제 형태일 수 있으며, 하나 또는 그 이상의 다른 효소제제를 첨가할 수 있다. 첨가되는 효소제제는 건조 또는 액체 상태가 모두 가능하며 효소제제로는 리파제(lipase)와 같은 지방 분해효소, 녹말과 글리코젠(glycogen) 등에 포함되어 있는 알파-1,4-글리코시드 결합(α -1,4-glycoside bond)을 가수분해하는 효소인 아밀라제(amyase), 유기인산에스테르를 가수분해하는 효소인 포스파타제(phosphatase), 셀룰로스(cellulose)를 분해하는 카르복시메틸셀룰라제(carboxymethylcellulase), 자일로스(xylose)를 분해하는 자일라나제(xylanase), 말토오스(maltose)를 두 분자의 글루코스(glucose)로 가수분해하는 말타제(maltase) 및 사카로스(saccharose)를 가수분해하여 글루코스-프루토스(glucose-fructose) 혼합물을 만드는 전환효소(invertase) 등과 같은 당 생성 효소로 구성된 균으로부터 선택되어 사용될 수 있다.

<49> 또한, 본 발명은 파이타제 또는 파이타제 생성 미생물이 첨가된 사료첨가제에 비병원성의 다른 미생물을 첨가할 수 있다. 첨가할 수 있는 미생물로는 단백질 분해 효소, 지질 분해 효소 및 당 전환 효소를 생산할 수 있는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 고초균, 소의 위와 같은 혐기적 조건에서 생리적 활성 및 유기물 분해능이 있는 락토바실러스 균주(*Lactobacillus* sp.), 가축의 체중을 증가시키며 우유의 산유량을 늘리고 사료의 소화 흡수율을 높이는 효과를 보여주는 아스퍼질러스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)와 같은 사상균(Slyter, L. L. *J. Animal Sci.* 1976, 43. 910-926) 및 사카로미세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)와 같은 효모(Jhonson, D. E et al. *J. Anim. Sci.*, 1983, 56, 735-739 ; Williams, P. E. V. et al, 1990, 211)로 구성된 균으로부터 선택되어 사용될 수 있다.

<50> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다.

<51> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<52> <실시예 1> 파이타제를 생산하는 균주의 분리

<53> 본 발명자들은 부산근교 해수 및 하수처리장의 시료로부터 파이타제를 생산하는 균주를 분리하였다. 구체적으로, 파이타제 생산능이 있는 균주를 탐색하기 위하여, 광안리입구 하수처리장, 송정, 해운대, 대변, 신선대, 이기대, 낙동강 하구언 등의 부산근교의 해수로부터 시료를 채취한 후 인공해수 평판배지에 도말하고, 30℃ 배양기에서 18시간 배양 후 각기 다른 형

태의 콜로니들을 선택하였다. 분리된 각각의 콜로니를 선택하여 1.5% 아가를 함유한 PSM(1.5% D-glucose, 0.5% calcium phytate, 0.5% NH_4NO_3 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% KCl, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 배지에 도말하여 30℃에서 2일간 배양한 후 자라난 균락 주변에 투명환이 생기는 균주를 1차적으로 선별하였다. 선별된 균들을 5 ml의 인공해수와 PSM 배지에 접종하여 30℃의 진탕배양기에서 24시간 배양한 후 배양액과 균체 침전물에서 파이타제 활성을 측정하여 최종적으로 활성이 높은 5 균주를 2차로 선별하였다. 본 발명자들은 상기와 같이 선별한 5균주를 임의로 각각 YH-11, YH-13, YH-15, YH-60 및 YH-103 이라 명명하였다.

<54> 본 발명자들은 상기 5개의 균주들이 생산하는 파이타제의 활성을 측정하였다(표 1). 효소 활성은 피스키(Fiske) 등의 무기인 정량법을 사용하였고, 배양액과 균체 침전물에서 파이타제 활성을 측정하였다. 일정비율로 희석한 100 μl 의 효소용액에 400 μl 의 기질용액(2 mM sodium phytate in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0)을 넣고 37℃에서 30분간 반응시킨 후 500 μl 5% TCA 용액을 가하고 0℃에 10분간 방치하여 반응을 정지시켰다. 대조군(Blank)은 효소용액에 TCA(Trichloroacetic acid) 용액을 넣고 효소를 불활성화 시킨 다음 기질용액을 가하여 방치하였다. 4 ml의 반응액(reagent) A (1:1:1:2 ratio of 6 N H_2SO_4 / 2.5% ammonium molybdate/ 10% ascorbic acid/ H_2O)를 가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 효소 반응용액과 대조군 액의 값의 차이를 820 nm에서 측정하였다. 효소의 1 유니트(unit)는 1분 동안에 1 μmole 의 인산염(phosphate)을 방출시키는 효소량으로 정하였다.

<55> 상기와 같이 파이타제 활성을 측정한 결과, YH-15 균주가 생산하는 파이타제의 활성이 가장 높은 것으로 나타났다(표 1).

56> 【표 1】

선별된 균주가 생산하는 파이타제의 활성

균주	YH-11	YH-13	YH-15	YH-60	YH-103
파이타제 활성	0.048 U/ml	0.041 U/ml	0.074 U/ml	0.052 U/ml	0.044 U/ml

57> <실시예 2> 파이타제를 생산하는 YH-15 균주의 특성 분석

58> 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 분리한 가장 높은 활성을 지닌 파이타제를 생산하는 YH-15 균주의 특성을 분석하였다.

59> YH-15 균주를 그람염색 결과 그람 음성균으로 나타났고, 전자현미경으로 조사한 결과 세포의 크기가 0.5 ~ 1.4 μm 크기의 간상 형이며 편모가 관찰되었다(도 1). 또한, 생화학적 및 생리학적 특성을 조사한 결과, 그람 음성균에 호기 및 혐기성 상태에 모두 생육하는 편성 호기성 미생물이고 오르니틴 디카복실라제에 양성, 인돌 생산능에 음성의 결과를 보였다. 기타 생화학적 및 생리학적 특성은 표 2에 기재된 바와 같다. 또한 상기 균주의 16S rRNA 서열을 분석한 결과 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 것으로 판명되었고, 상기 16S rRNA 염기서열은 사이트로박터 브라키균과 99%의 상동성을 보였으며 이외에 사이트로박터 프라운디와 사이트로박터 베크마니, 엔테로박터 에어로지너스균과 98%로 높은 상동성을 나타내었다.

60> 본 발명자들은 상기 균주의 형태적, 생리생화학적 특성 및 16S rDNA 분석결과를 바탕으로 본 발명에서 분리한 균주를 신규한 사이트로박터 브라키로 동정하였다.

61> 본 발명자들은 상기 균주를 "사이트로박터 브라키 YH-15"라 명명하고, 이를 2002년 9월 26일자로 한국미생물보존센터(KCCM)에 기탁하였다(수탁번호 : KCCM 10427).

<62> 【표 2】

사이트로박터 브라키 YH-15 균주의 특성

특성	사이트로박터 브라키 YH-15
그람 염색	음성
형태 및 크기	0.5 × 1.4 μ m
이동성	+
사이트레이트 이용능	+
인돌 생산능	-
아세톤 생산능	-
황화수소 생성능	-
젤라틴 액화능	-
오르니틴 디카르복실라제	+
라이신 디카르복실라제	-

<63> <실시예 3> 사이트로박터 브라키 YH-15가 생산하는 파이타제의 분리 및 정제

<64> 본 발명자들은 상기 실시예 2에서 동정한 사이트로박터 브라키 YH-15 균주가 생산하는 파이타제를 정제하기 위하여, 상기 균주를 최적배양조건에서 키운 후 효소를 분리 정제하였다.

<65> <3-1> 파이타제 효소의 생산

<66> 본 발명의 사이트로박터 브라키 YH-15를 1% 트립톤, 0.5% 효모추출액 및 0.5% NaCl을 포함한 LB 배지를 이용하여 30℃에서 15시간 배양한 종 배양액을 1% 되도록 재접종하여 효소를 생산하였다. 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 파이타제의 활성을 측정한 결과, 30℃ 16시간 이 경과 후 파이타제 활성이 최고에 도달하였으며 이때 효소생산량은 0.2 unit/ml 이었다.

<67> <3-2> 파이타제의 분리·정제

<68> 사이트로박터 브라키 YH-15 균주가 생산하는 파이타제를 하기와 같이 순수 분리하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <3-1>에서 배양한 후 원심분리하여 회수한 균체를 20 mM 소듐 아세테이트(sodium acetate; pH 5.0) 완충액에 녹인 다음 세포파쇄기(30kHz, 30분)로 세포를 파쇄한 후 12,000 g, 20분 동안 원심 분리하여 상등액을 회수하였다. 상기와 같이 수득한 상등액에 황산암모늄분말을 70% 포화되게 가하고, 12,000 g의 원심력으로 20분 동안 원심분리를 통해 침전물을 회수하였다. 상기의 침전물에 소듐 아세테이트(pH 5.0) 완충액을 가하여 침전물을 용해시킨 다음, 동일한 완충액을 사용하여 투석을 수행하였다. 투석한 다음 상기 용액을 원심분리를 하고, 상등액을 수득하여 페닐(Phenyl-), DEAE- 와 CM-세파로스(CM-Sepharose) 컬럼 및 Mono S HR 5/5 컬럼을 수행하여 파이타제를 분리하였다.

<69> 첫 번째로, 페닐-세파로스(Phenyl-Sepharose) 컬럼을 이용한 분리과정은 다음과 같다.

1.5 M 황산암모늄이 첨가된 소듐 아세테이트(pH 5.0) 완충액으로 평형화된 페닐-세파로스 컬럼에 동량의 황산암모늄을 첨가한 조효소액을 가하고, 동일한 완충액으로 컬럼을 충분히 세척하였다. 황산암모늄의 농도를 0.5 M에서 0 M까지 점차로 감소시키면서 완충액을 컬럼에 가함으로써 흡착된 단백질들을 순차적으로 용출시켰다. 파이타제는 0.3 M 황산암모늄으로 용출하였다.

<70> 두 번째로, DEAE 컬럼을 이용한 분리과정은 다음과 같다.

<71> 페닐-세파로스 컬럼을 통해서 얻은 파이타제 용액을 투석을 통해 트리스 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0)으로 평형화시켰다. 동일한 완충액으로 평형화된 DEAE-세파로스 컬럼에 파

이타제 용액을 가하고 동일한 완충액을 계속적으로 컬럼에 가하여 파이타제 활성이 높은 비-부착(non-binding) 분획을 모아서 농축 후, 20 mM 소듐 아세테이트(pH 5.0)를 이용한 CM-세파로스 컬럼을 사용하였다. 동일한 완충액으로 컬럼을 충분히 세척한 후 염화나트륨의 농도를 0에서 1 M 까지 점차로 증가시키면서 흡착된 단백질들을 순차적으로 용출시켰으며, 0.6 M 염화나트륨으로 용출하였다.

<72> 마지막으로, CM-세파로스와 동일한 완충액을 사용하여 Mono S HR 5/5 FPLC 컬럼을 수행하였다. 0.1 M 염화나트륨으로 파이타제를 용출하여 최종적으로 순수분리하였다.

<73> <3-3> 파이타제의 효소 활성 측정

<74> 상기 실시예 <3-2>의 각각의 정제 단계에서 수득한 시료에서의 파이타제 효소 활성을 측정하였다(표 3). 단백질 함량은 Sigma사의 BCA단백질 정량 키트를 이용하여 측정하였으며, 이때 표준단백질로 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다. 최종적으로 순수 분리된 파이타제의 파이테이트에 대한 비활성(specific activity)은 3,457 units/mg이었으며, 회수율 28%, 12,950 배로 정제되었다(도 2).

<75> 【표 3】

사이트로박터 브라키 YH-15 균주로부터 분리한 파이타제의 총 단백질양, 활성, 정제 및 회수율

정제 단계	총활성 (U)	총단백질 (mg)	비활성 (U/mg)	농축도 (배)	회수율 (%)
세포 파쇄액	1,453	5,443	0.27	1.00	100
황산암모늄 침전물	1,380	1,593	0.87	3.25	95
페닐 세파로스	941	72.19	13.04	48.85	65
DEAE 세파로스	756	17.19	43.98	164	52
CM 세파로스	459	0.71	646	2,421	32
Mono S HR 5/5	413	0.12	3,457	12,950	28

<76> <실시예 4> 파이타제의 특성

<77> <4-1> 파이타제의 분자량 및 N-말단 아미노산 서열 결정

<78> 본 발명자들은 순수 분리된 파이타제를 SDS-PAGE 전기영동법으로 분자량을 측정하였다.

도 3에서 레인 1은 크기를 알고 있는 마커 단백질들이고, 레인 2는 Mono S 컬럼을 거쳐 최종적으로 정제된 파이타제 단백질을 나타낸 것이다. 분자량을 측정한 결과, 본 발명의 파이타제는 약 47,000 달톤의 분자량을 갖고 있는 것으로 나타났다.

<79> 또한, 분리된 파이타제 단백질을 단백질/펩타이드 시퀀서(Protein/peptide Sequencer; Applied Biosystem, USA)를 이용하여 N-말단 아미노산 서열을 결정한 결과, 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것으로 나타났다. 서열번호 2로 기재되는 N-말단 서열을 기존의 밝혀진 대장균(*Escherichia coli*) 유래 파이타제 효소(R. Greiner 등 Arch. Biochem. Biophys. 1993, 303, 107-113), 아스퍼질러스 피쿰(*Aspergillus ficuum*) 유래 파이타제 효소(A.H. Ullah 등 Prep. Biochem. 1988, 18, 443-458), 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 유래 파이타제 효소(Y.O. Kim 등 FEMS Microbiol Lett, 1998, 162, 185-191)의 N-말단 아미노산 서열과 비교한 결과 유

사성을 찾을 수 없었다(표 4). 따라서 본 발명의 사이트로박터 브라키 YH-15가 생산하는 파이타제는 신규 효소임을 알 수 있었다.

<80> 【표 4】

신규효소와 기존효소의 N-말단 아미노산 서열 비교

효소명	N-말단 아미노산 서열
사이트로박터 브라키 YH-15 파이타제	서열번호 2(E-E-Q-N-G-M-K-L-E-R)
<i>E. coli</i> 유래 파이타제	서열번호 3(S-E-P-E-L-K-L-E-N-A-V-V)
<i>A. ficuum</i> 유래 파이타제	서열번호 4(F-S-Y-G-A-A-I-P-Q-S-T-Q-E-K-Q)
<i>Bacillus</i> 유래 파이타제	서열번호 5(S-D-P-Y-H-F-T-V-N-A-A-X-E-T-E)

<81> <4-2> 파이타제의 온도 및 pH에 따른 효소 활성

<82> 본 발명자들은 Mono S 컬럼을 통해 정제된 파이타제를 가지고 파이타제의 온도 및 pH 변화에 따른 효소 활성을 조사하였다.

<83> 도 4의 A는 온도에 따른 효소의 활성을 나타낸 것으로 50℃에서 가장 높은 활성을 보였으며, 50℃에서 1시간까지 안정하였고, 55℃에서 10분간 방치 시 75% 정도의 잔존활성을 보였다.

<84> 도 4의 B는 pH에 따른 효소의 활성을 나타낸 것으로 pH 4.0에서 가장 높은 활성을 보였으며 pH 2.5에서도 50%의 효소활성을 보였다. 37℃ 7일까지 pH 3.0-4.5에서 매우 안정하였으며, pH 7에서도 50%의 잔존활성을 보였다. 그리고 pH 3.0 미만에서는 4시간 방치시에 효소활성의 대부분을 잃음을 확인하였다. 상기와 같은 온도 및 pH 실험에 대한 결과는 본 발명의 파이타제 효소를 단위동물의 사료첨가제로 사용하기에 적합한 것으로 판단되었다.

<85> <4-3> 파이타제의 금속이온 및 저해제에 따른 효소 활성

<86> 본 발명자들은 금속이온과 저해제가 본 발명의 파이타제의 활성에 미치는 영향을 알아보았다. 다양한 금속이온 중 10 mM 이하의 농도에서 Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} 에 효소활성이 강하게 억제되었으며, NaCl의 경우는 1 M 농도에서도 50%의 잔존활성을 보였다(표 5).

<87> 또한, 저해제에 대한 영향을 조사한 결과 이중 황결합에 관여한 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol)과 디토트레이톨(dithothreitol)은 효소 활성에 크게 영향을 안 미쳤으며, 8 M 우레아(urea) 또는 0.0024% SDS에는 37℃에서 2시간 방치시에 대부분 효소활성을 상실했다.

<88> 【표 5】

YH-15 파이테이즈의 금속이온 및 저해제에 대한 영향

금속이온 또는 저해제	농도 (mM)	상대 활성 (%)
첨가하지 않음		100
EDTA	6	98
KCl	6	95
MgCl ₂	6	71
ZnSO ₄	8	33
FeCl ₃	6	19
MnCl ₂	6	92
CuSO ₄	6	38
NiSO ₄	6	88
CaCl ₂	6	87
CdCl ₂	6	101
NaCl	6	102
	1000	54

<89> <4-4> 파이타제의 기질 특이성

90> 파이타제의 다양한 포스페이트 에스테르 화합물에 대한 기질특이성을 조사한 결과, 표 6과 같이 파이테이트에 특이적으로 높은 분해능이 있었으며 다른 포스페이트 에스테르 화합물에는 거의 분해능이 없었다. 또한, 소듐 파이테이트(Sodium phytate)에 대한 Km 값은 0.46 mM이며, Vmax 값은 6,027 U/mg이었다.

91> 【표 6】

YH-15 파이타제의 기질 특이성

기질	상대활성(%)
파이테이트	100
p-니트로페닐 포스페이트	11.27
테트라소듐 피로포스페이트	5.95
ATP	1.86
ADP	1.04
글리세로포스페이트	0.57
글루코스-1-포스페이트	0.42
글루코스-6-포스페이트	0.33
프럭토스-6-포스페이트	0.75
만노스-6-포스페이트	0.01

92> <4-5> 파이타제의 효소 활성화에 미치는 단백질 가수분해 효소의 영향

93> 단백질 가수분해효소가 파이타제의 효소활성에 미치는 영향을 알아보았다. 펩신(Pepsin)과 트립신(trypsin)의 경우는 37℃ 2시간 방치 시에 효소 활성화에 전혀 변화가 없었고, 파파인(papain), 엘라스타제(elastase), 판크레아틴(pancreatin)의 경우는 70 ~85%의 잔존 효소활성을 보였다.

94> 상기와 같은 특성은 본 발명의 파이타제를 단위동물에 투여시 장이나 위에 존재하는 단백질 가수분해 효소에 대해 저항성을 가져 효소의 이용성을 좋게 하는 장점이 있다.

95> <실시예 5> 파이타제 유전자의 클로닝 및 염기서열 결정

96> 올리고뉴클레오타이드 탐침은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열에 기초하여 설계하였으며, 유전자 합성기(Applied Biosystems ABI 380B DNA synthesizer)를 이용하여 합성하였다.

97> 사이트로박터 브라키 유래의 염색체 DNA를 분리하여 *EcoRI* 및 *XhoI*, *EcoRI*, *SphI*, *BamHI* 및 *HindIII*, *EcoRI* 및 *HindIII*, *EcoRI* 및 *BamHI*, *PstI* 의 제한효소를 이용하여 자르고 전기영동 수행 후 나일론 막에 이동시켰다. 상기에서 합성한 서열번호 8로 기재되는 올리고뉴클레오타이드를 DIG으로 표지한 후 서던 교잡반응을 수행한 결과 제한효소 *PstI* 을 사용시 7.5 kb에서, *EcoRI*과 *BamHI*를 사용시 4.5 kb에서 신호를 확인할 수 있었다(도 5).

98> <5-1> 파이타제 유전자의 클로닝

99> 사이트로박터 브라키 유래의 염색체 DNA를 *PstI* 으로 자른 후 7.5kb 조각만 분리 후, *PstI* 으로 자르고 포스파타제(calf intestinal phosphatase)를 처리한 pBluscript SK벡터 (STRATAGENE, USA)에 상기 DNA를 삽입시킨 후 대장균 XL1-Blue(STRATAGENE, USA)에 형질전환시켰다. 상기 형질전환 균주를 암피실린(ampicillin) 및 1% 트립톤, 0.5% 효모추출액, 0.5% NaCl 이 첨가된 1.5% 아가(agar) LB 플레이트에 도말한 후 콜로니를 나일론막에 옮겼다. 상기에서 올리고뉴클레오타이드 탐침을 이용하여 콜로니 교잡반응(colony hybridization)을 수행하여 반응을 나타내는 콜로니를 선별한 후 플라스미드를 분리하였다.

100> 그 결과 7.5 kb 크기의 삽입체(insert) DNA를 포함하는 10.5 kb 크기의 플라스미드임을 확인하고, pB-phyF로 명명하였다.

101> pB-phyF을 대장균 XL1-Blue에 재형질전환시킨 후 실시예 <3-3>의 방법으로 파이타제 활성을 측정한 결과, 생성된 콜로니의 100%가 파이타제 활성을 나타냄을 확인하였다.

102> <5-2> 신규 파이타제 유전자의 염기 서열 분석

103> 상기 실시예 <5-1>에서 분리된 pB-phyF의 염기 서열을 분석하였다. 염기 서열은 염색 DNA 염기서열 키트(Big Dye DNA Sequencing kit, Perkin-Elmer, Applied Biosystem)와 ABI PRISM 염기 서열 분석기(Perkin-Elmer)를 이용하여 분석하였다. 상기 자동 염기 서열 분석기를 통하여 분석된 염기서열을 DNASTAR 아미노산 서열 분석 프로그램(DNASTAR, Inc.)에 입력하여 1302개의 염기로 이루어진 서열번호 6으로 기재되는 파이타제의 전사해독틀을 결정하였다. 전사해독틀은 22개의 아미노산으로 이루어진 신호서열과 411개의 아미노산으로 이루어진 활성 파이타제로 구성되어 있다. 신호서열을 제거한 활성파이타제의 분자량은 약 47,000 Da로 계산되었다.

104> 상기의 과정을 거쳐 분석된 신규 파이타제의 아미노산 서열을 BLAST 프로그램을 이용하여 GenBank 및 SWISSPROT에 있는 아미노산 서열과 비교 분석한 결과, 대장균(*Escherichia coli*)이 생산하는 파이타제와 60%의 매우 낮은 상동성을 나타냄을 확인함으로써, 본 발명의 사 이트로박터 브라키의 파이타제가 신규한 효소임을 확인하였다.

【발명의 효과】

- 105> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 신규 사이트로박터 브라키는 신규한 파이타제를 생산하며, 상기 파이타제는 기존에 밝혀진 파이타제에 비하여 높은 효소활성을 나타낸다. 따라서 본 발명의 파이타제 또는 이를 생산하는 사이트로박터 브라키는 단위동물의 사료 제조시 첨가제로 이용할 수 있으며 또한 저렴하게 파이트산의 특정 분해산물의 회수에도 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 파이타제는 단백질 가수분해 효소에 대해 높은 저항성을 갖기 때문에 단위동물에 투여시 장이나 위에서 분해되지 않고 높은 활성을 나타낼 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

하기 (a) 내지 (f)의 특징을 가지는 파이타제.

(a) 분자량 : SDS-PAGE 상에서 분자량은 약 47 kDa,

(b) 최적 pH : pH 3.5-pH 4.5,

(c) 최적온도 : 45-55℃에서 최대 활성,

(d) 기질특이성 : 파이테이트, p-니트로페닐 포스페이트, 테트라소듐 피로포스페이트,

ATP 또는 ADP를 기질로 하여 작용,

(e) 파이테이트를 기질로 했을 때 미카엘리스 정수가 0.3-0.5 mM, 및

(f) 펩신, 트립신, 파파인, 엘라스타제 및 판크레아틴으로 구성된 군으로부터 선택된 단백질 가수분해효소에 대하여 높은 저항성

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 파이타제는 N-말단에 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 파이타제.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 서열번호 7로 기재되는 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 파이타제.

【청구항 4】

제 1항의 파이타제를 암호화하는 유전자.

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 서열번호 6으로 기재되는 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 파이타제 유전자.

【청구항 6】

제 1항의 파이타제를 생산하는 사이트로박터 브라키 YH-15 균주(수탁번호 : KCCM 10427).

【청구항 7】

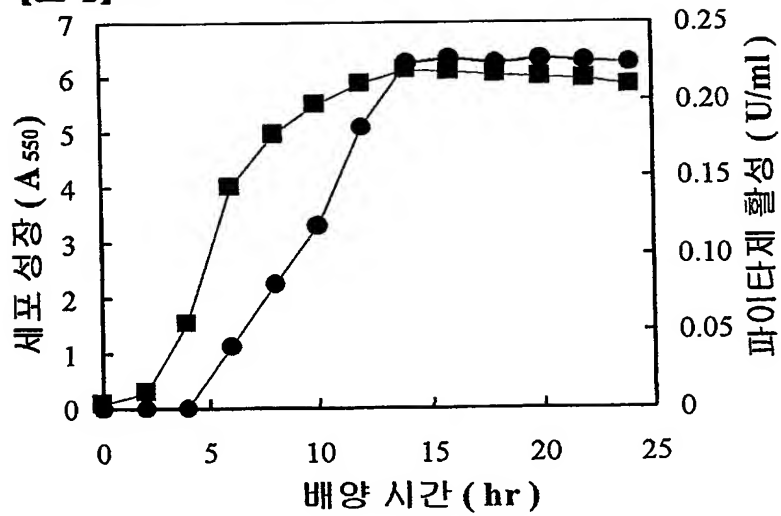
제 1항의 파이타제 또는 제 6항의 균주를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제.

【도면】

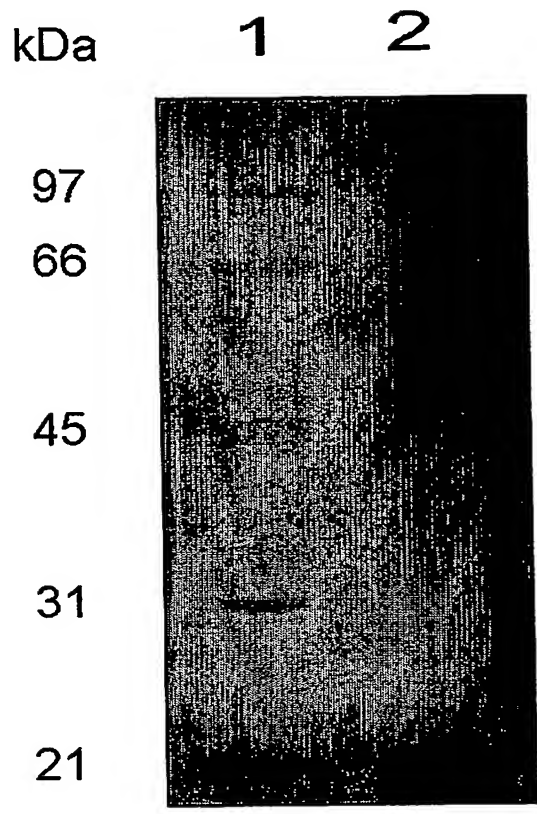
【도 1】



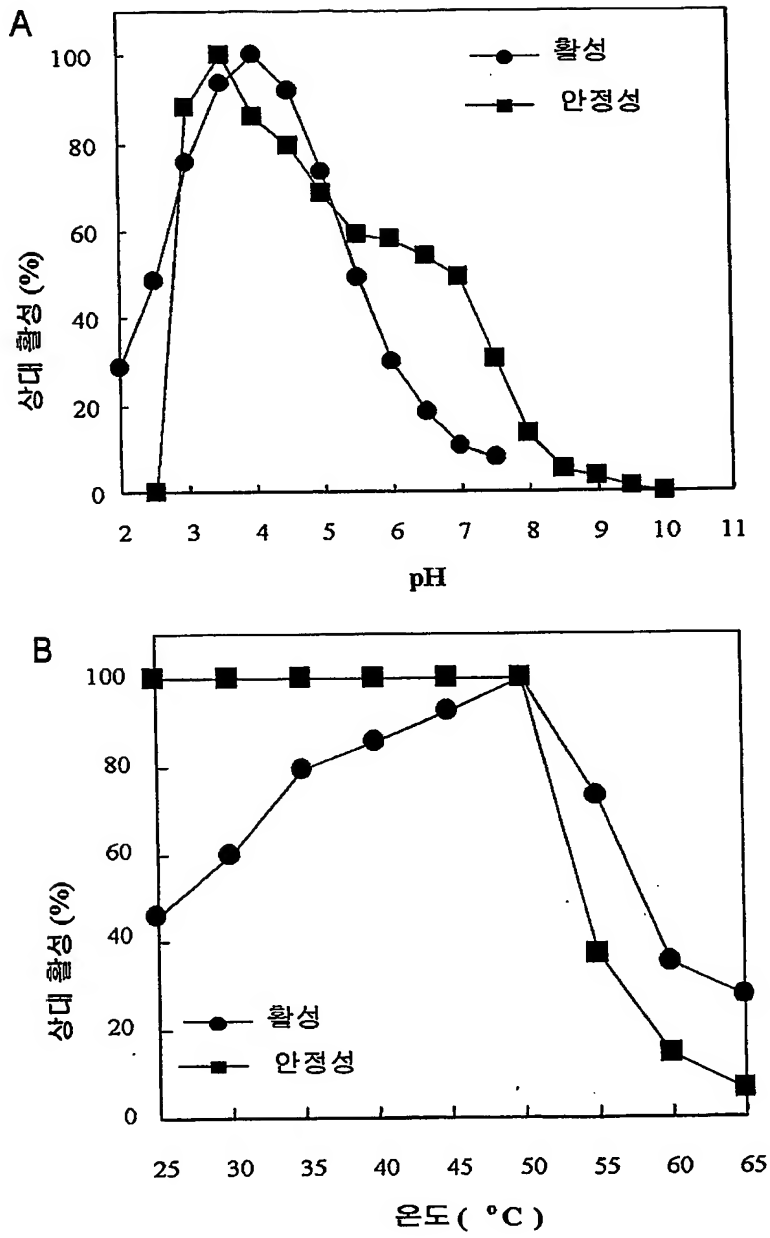
【도 2】



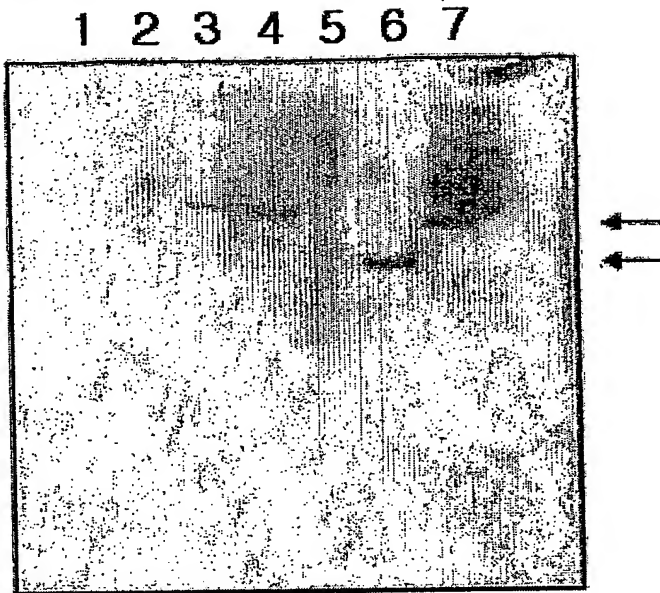
【도 3】



【도 4】



【도 5】



【서열목록】

<110> Republic of Korea represented by the president of Republic of National Fisheries Research and Development Institute <120> Phytase produced from *Citrobacter braakii* <130> 3p-02-25 <160> 8 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 1481 <212> DNA <213> *Citrobacter braakii* YH-15 <400> 1

tagagtttga tcctggctca gattgaacgc tggcggcagg cctaacacat gcaagtcgaa 60 cggtagcaca gaggagcttg
ctccttgggt gacgagtggc ggacgggtga gtaatgtctg 120 ggaaactgcc cgatggaggg ggataactac tggaaacggt
agctaatacc gcataacgtc 180 gcaagaccaa agagggggac cttcgggcct cttgccatcg gatgtgcca gatgggatta
240 gctagtaggt ggggtaacgg ctacacctagg cgacgatccc tagctgtgtc gagaggatga 300 ccagccacac tggaactgag
acacggtcca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata 360 ttgcacaatg ggcgcaagcc tgatgcagcc atgccgcgtg
tatgaagaag gccttcgggt 420 tgtaaagtac tttcagcgag gaggaaggtg ttgtggttaa taaccgcagc aattgacgtt
480 actcgcagaa gaagcaccgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtaatat ggagggtgca 540 agcgtaaact ggaattactg
ggcgtaaagc gcacgcaggc ggtctgtcaa gtcggatgtg 600 aaatccccgg gctcaacctg ggaactgcat ccgaaactgg
caggctagag tctttagag 660 ggggtagaa ttccaggtgt agcggtgaaa tgcgtagaga tctggaggaa taccggtggc
720 gaaggcggcc ccttgacaa agactgacgc tcaggtgcga aagcgtgggg agcaaacagg 780 attagatacc ctggtagtcc
acgccgtaaa cgatgtcgac ttggaggttg tgcccttag 840 gcgtggcttc cggagctaac gcgttaagtc gaccgcctgg

ggagtacggc cgcaaggtaa 900 aaactcaaat gaattgacgg gggcccgac aagcgggtga gcatgtggtt taattcgatg
 960 caacgcgaag aaccttacct actcttgaca tccagagaac ttagcagaga tgctttggtg 1020 ccttcgggaa ctctgagaca
 ggtgctgcat ggctgtcgtc agctcgtgtt gtgaaatgtt 1080 gggttaagtc ccgaacgag cgcaaccctt atcctttgtt
 gccagcgggtt cggncgggaa 1140 ctcaaaggag actgccagtg ataaactgga ggaaggtggg gatgacgtca agtcatcatg
 1200 gcccttacga gtagggctac acacgtgcta caatggcata tacaagaga agcgacctcg 1260 cgagagcaag cggacctcat
 aaagtatgtc gtagtccgga ttggagtctg caactcgact 1320 ccatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgtgg atcagaatgc
 cacggatgaat acgttcccg 1380 gccttgtaca caccgccgt cacacatgg gatlgggttg caaagaagt aggtagctta
 1440 accttcggga gggcgcttac ctctttggat tcagatgggg a 1481 <210> 2 <211> 10 <
 212> PRT <213> Citrobacter braakii YH-15 <400> 2 Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg 1
 5 10 <210> 3 <211> 12 <212> PRT <213> Escherichia coli <400> 3 Ser Glu Pr
 Glu Leu Lys Leu Glu Asn Ala Val Val 1 5 10 <210> 4 <211> 15
 <212> PRT <213> Aspergillus ficuum <400> 4 Phe Ser Tyr Gly Ala Ala Ile Pro Gln Ser Thr Gln Glu Ly
 Gln 1 5 10 15 <210> 5 <211> 15 <212> PRT <213>
 Bacillus sp. <400> 5 Ser Asp Pro Tyr His Phe Thr Val Asn Ala Ala Xaa Glu Thr Glu 1 5
 10 15 <210> 6 <211> 1302 <212> DNA <213> Citrobacter braakii YH-15 <220>
 <221> gene <222> (1)..(1302) <223> phytase gene <400> 6 atgagtacat. tcatcattcg tttattaatt
 ttttctctct tatgcggttc tttctcaata 60 catgctgaag agcagaacgg catgaaactg gagcgggttg tgatagttag
 ccgtcatgga 120 gtaagagcac ctacgaagtt cactccaata atgaaagatg tcacaccga ccaatggcca 180
 caatgggatg tgccgttagg atggctaacg cctcgtgggg gagaactgt tttcgaatta 240 ggtcagtatc aacgtttatg
 gttcacaagc aaaggtctgt tgaataatca aacgtgccca 300 tctccagggc aggttgctgt tattgcagac acggatcaac
 gcacccgtaa aacgggtgag 360 gcgtttctgg ctgggttagc accaaaatgt caaattcaag tgcattatca gaaggatgaa
 420 gaaaaaatg atcctctttt taatccggtg aaaatgggga aatgttcgtt taacacattg 480 aaggttaaaa acgtattct
 ggaacgggcc ggaggaaata ttgaactgta tacccaacgc 540 tatcaatctt catttcggac cctggaaaat gttttaatt
 tctcacaatc ggagacatgt 600 aagactacag agaagtctac gaaatgcaca ttaccagagg ctttaccgtc tgaatttaag
 660 gtaactcctg acaacgtatc attacctggt gcctggagtc tttcttccac gctgactgag 720 atatttctgt tgcaagaggc

ccaggggaatg ccacaggtag cctgggggcg tattacggga 780 gaaaaagaat ggagagattt gttaagtctg cataacgctc
 agtttgatct ttigcaaaga 840 actccagaag ttgccgtag tagggccaca ccattactcg atatgataga cactgcatta
 900 ttgacaaatg gtacaacaga aaacaggtat ggcataaaat taccgtatc tctgttgttt 960 attgctggtc atgataccaa
 tcttgcaaat ttaagcgggg ctttagatct taagtggctg 1020 ctgcccggtc aaccgataa taccctcct ggtggggagc
 ttgtattcga aaagtggaaa 1080 agaaccagtg ataatacga ttgggttcag gtttcatttg tttatcagac gctgagagat
 1140 atgagggata ttcaaccgtt gtcgttagaa aaacctgctg gaaaagtga tttaaaatta 1200 attgcatgtg aagagaaaaa
 tagtcaggga atgtgttcgt taaaaagttt ttccaggctc 1260 attaaggaaa ttcgctgcc agagtgtgca gttacggaat aa
 1302 <210> 7 <211> 433 <212> PRT <213> Citrobacter braakii YH-15 <220> <221> PEPTIDE <222>
 (1)..(433) <223> phytase <400> 7 Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Ile Phe Ser Leu Leu Cys Gly 1
 5 10 15 Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg
 20 25 30 Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Th
 35 40 45 Pro Ile Met Lys Asp Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Va
 50 55 60 Pro Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Le
 65 70 75 80 Gly Gln Tyr Gln Arg Leu Trp Phe Thr Ser Ly
 Gly Leu Leu Asn Asn 85 90 95 Gln Thr Cys Pro Ser Pro
 Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp 100 105 110 Gln Arg
 Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro 115 120 12
 Lys Cys Gln Ile Gln Val His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Asn Asp 130 135
 140 Pro Leu Phe Asn Pro Val Lys Met Gly Lys Cys Ser Phe Asn Thr Leu 145 150
 155 160 Lys Val Lys Asn Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu
 165 170 175 Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val
 Leu 180 185 190 Asn Phe Ser Gln Ser Glu Thr Cys Lys Thr Thr
 Glu Lys Ser Thr Lys 195 200 205 Cys Thr Leu Pro Glu Ala Leu Pro
 Ser Glu Phe Lys Val Thr Pro Asp 210 215 220 Asn Val Ser Leu Pro Gly
 Ala Trp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Glu 225 230 235 240

Ile Phe Leu Leu Gln Glu Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly 245 250
 255 Arg Ile Thr Gly Glu Lys Glu Trp Arg Asp Leu Leu Ser Leu His Asn 260 265
 270 Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg 275 280
 285 Ala Thr Pro Leu Leu Asp Met Ile Asp Thr Ala Leu Leu Thr Asn Gly 290 295
 300 Thr Thr Glu Asn Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe 305 310
 315 320 Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp
 325 330 335 Leu Lys Trp Ser Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly
 Gly 340 345 350 Glu Leu Val Phe Glu Lys Trp Lys Arg Thr Ser
 Asp Asn Thr Asp Trp 355 360 365 Val Gln Val Ser Phe Val Tyr Gln
 Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile 370 375 380 Gln Pro Leu Ser Leu Glu
 Lys Pro Ala Gly Lys Val Asp Leu Lys Leu 385 390 395 400
 Ile Ala Cys Glu Glu Lys Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser 405 410
 415 Phe Ser Arg Leu Ile Lys Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr 420 425
 430 Glu <210> 8 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> primer for the
 detection of phytase gene <400> 8 gargarcaga ayggyatgaa actggarcgy

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**